

Cómo comunicar datos *in vitro*

Guía práctica 1:

Versión 1.1 – Septiembre de 2012



AVISO LEGAL
La información que contiene la presente guía práctica no constituye asesoramiento jurídico ni representa necesariamente, en términos legales, la posición oficial de la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos. La Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos no se hace responsable del contenido de este documento.

Cláusula de exención de responsabilidad: El presente documento es una traducción operativa de un documento original en inglés. Dicho original puede encontrarse en la página web de la ECHA.

Versión	Cambios
1 de Marzo de 2010	Primera publicación
1. 1 – Septiembre de 2012	

Guía práctica 1: Cómo comunicar datos in vitro

Referencia: ECHA-10-B-04.1-ES
ISBN-13: 978-92-9217-753-9-6
ISSN: 1831-6727
Fecha publ.: Septiembre de 2012
Lengua: ES

Este documento se publicará en las 22 lenguas siguientes:

Alemán, búlgaro, checo, danés, eslovaco, esloveno, español, estonio, finés, francés, griego, húngaro, inglés, italiano, letón, lituano, maltés, neerlandés, polaco, portugués, rumano y sueco

Si tiene alguna duda o comentario con respecto a este documento, por favor utilice el formulario de solicitud de información (citando la referencia y la fecha de publicación). El formulario de solicitud de información está disponible en la siguiente dirección de Internet: http://echa.europa.eu/about/contact_es.asp

Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos

Dirección postal: P.O. Box 400, FI-00121 Helsinki, Finlandia
Dirección de visita: Annankatu 18, Helsinki, Finlandia

Índice

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales objetivos del Reglamento REACH (CE nº 1907/2006) es proteger la salud humana y el medio ambiente. Para ello, es necesario conseguir información adecuada sobre las propiedades de las sustancias químicas con el fin de decidir acerca de su clasificación y etiquetado o la evaluación del riesgo.

Los solicitantes de registro han de presentar información con fines de registro y evaluación con arreglo a lo especificado en los anexos VI-XI del Reglamento REACH.

De acuerdo con el apartado 1 del artículo 13 y el apartado 1 del artículo 25 de REACH, se podrá obtener información por medios distintos de los ensayos y sólo deberán realizarse ensayos con animales vertebrados como último recurso. Además, el artículo 13, apartado 4, de REACH especifica que los ensayos y análisis ecotoxicológicos y toxicológicos se llevarán a cabo cumpliendo las disposiciones de la Directiva 86/609/CEE.

El Reglamento REACH también tiene por objeto perfeccionar, disminuir y sustituir los ensayos con animales (estrategia 3R), así como promover métodos de ensayo alternativos (conforme a la Directiva 86/609/CEE). La Directiva 86/609/CEE del Consejo, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, requiere el desarrollo, validación y aceptación de métodos que puedan disminuir, perfeccionar o sustituir el empleo de animales de laboratorio.

Como consecuencia de la promoción de métodos alternativos, varios métodos de ensayo *in vitro* se han sometido a validación internacional y se han aceptado para uso reglamentario. La validación es el proceso por el que se determina la fiabilidad y relevancia de un procedimiento para un fin concreto.

En la UE, el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (CEVMA) de la Dirección General Centro Común de Investigación (DG CCI) es el responsable de la coordinación de la validación científica de nuevos métodos de ensayo alternativos. La evolución de nuevos métodos de ensayo tiene cinco pasos principales: el desarrollo del ensayo, la fase de prevalidación, la fase de validación, la evaluación independiente y, por último, el progreso hacia la aceptación reglamentaria. El proceso de prevalidación es esencial para determinar si un método incluido en un estudio de validación formal cumple adecuadamente los criterios definidos para ser incluido en dicho estudio.

En el documento de orientación REACH sobre los requisitos de información (R.4) se describen los principios y criterios de validación y prevalidación para determinar cómo deben llevarse a cabo los estudios de validación de métodos de ensayo nuevos o actualizados, adoptados del documento de orientación 34 de la OCDE.

Debido a la alta prioridad que otorga la UE a la adopción de métodos alternativos validados y relevantes y a las ventajas de la coordinación con el programa de Directrices de ensayo de la OCDE para alcanzar una armonización y aceptación global, los proyectos relativos a métodos alternativos se someten preferentemente al proceso de la OCDE. No obstante, en caso de retraso indebido en ese foro o de necesidad urgente en la UE, el trabajo sobre la adopción de un nuevo método alternativo puede realizarse en paralelo o ser pasado directamente al proceso de la UE de forma exclusiva. Si ese método es posteriormente aceptado en la OCDE, el método de la UE se actualizará en consecuencia.

2. UTILIZACIÓN DE MÉTODOS Y DATOS *IN VITRO* EN REACH

Los datos generados por los métodos de ensayo *in vitro* pueden utilizarse en REACH siempre que la información relativa al parámetro considerado sea suficiente a efectos de la clasificación y etiquetado y/o de la evaluación de riesgos. Estos datos pueden utilizarse para la sustitución total o parcial de los requisitos de información que de otro modo deberían generarse con datos de métodos *in vivo*. Sin embargo, los datos *in vitro*, incluidos los obtenidos por métodos que no se ajusten a criterios de validación internacionalmente acordados (adecuación e idoneidad) para un parámetro específico, se tendrán igualmente en cuenta y se presentarán en el expediente de registro como parte de la recopilación de toda la información disponible y se utilizarán en el procedimiento de ponderación de las pruebas (anexo XI, punto 1.2) o para apoyar la agrupación de sustancias (anexo XI, punto 1.5).

Hay tres categorías de métodos y datos *in vitro* que pueden utilizarse para registrar sustancias conforme al Reglamento REACH, concretamente los métodos *in vitro* validados (adecuados), los métodos *in vitro* prevalidados y otros datos *in vitro* obtenidos utilizando métodos *in vitro* no prevalidados.

a. Métodos *in vitro* validados

Los métodos *in vitro* validados, una vez decididos según criterios científicos conforme a principios de validación consensuados internacionalmente (R4 y OCDE GD 34), pueden sustituir total o parcialmente a un ensayo *in vivo* según el fin para el que se haya validado y adoptado dicho método. Algunos métodos de ensayo *in vitro* pueden formar parte de la información estándar requerida a diferentes intervalos de tonelaje (por ejemplo, ensayos *in vitro* de irritación dérmica o ensayos *in vitro* para evaluar la mutagenicidad). Estos son métodos validados que ha demostrado ser adecuados e idóneos para facilitar información destinada a utilizarse con fines de clasificación y etiquetado o evaluación de riesgos.

b. Métodos *in vitro* prevalidados

Los ensayos *In vitro* que cumplen criterios de prevalidación aceptados internacionalmente (R4 y OCDE GD 34) también se consideran idóneos para utilizarse conforme a REACH cuando los resultados de dichos ensayos indican la existencia de una propiedad peligrosa. Sin embargo, si los resultados de métodos prevalidados no indicasen una propiedad peligrosa (resultados negativos), habrán de ser confirmados con el ensayo relevante especificado en los anexos VII-X para el parámetro correspondiente (anexo XI, punto 1.4). Cuando se utilicen métodos *in vitro* prevalidados, será necesario indicar en el expediente de registro los criterios del CEVMA para entrar en la fase de prevalidación incluyendo pruebas de la reproducibilidad del método, su relevancia mecanística y su capacidad predictiva.

c. Métodos *in vitro* no prevalidados

Además, los métodos prevalidados y otros datos *in vitro* (no prevalidados) pueden utilizarse en el contexto de la recopilación de información para proporcionar datos adicionales para la evaluación e interpretación de datos *in vivo* o *in vitro* como parte del mecanismo de acción (por ejemplo, datos *in vitro* cinéticos, toxicogenómica o metabolómica) y para facilitar la adaptación del régimen de ensayos estándar según lo especificado en el anexo XI (utilización de datos existentes, extrapolación y agrupación de sustancias químicas y ponderación de las pruebas). Sin embargo, en cada caso deberá quedar claro, justificado y bien documentado el motivo para utilizar dichos métodos en el expediente de registro. Cuando proceda (por ejemplo, métodos prevalidados utilizados como pruebas

complementarias), deberán indicarse los criterios de idoneidad especificados en el documento de orientación.

3. PREGUNTAS SOBRE EL USO Y DOCUMENTACIÓN O COMUNICACIÓN DE DATOS Y MÉTODOS *IN VITRO* CON FINES DE REGISTRO EN REACH

3.1. ¿Qué documentos de orientación de REACH debería leer?

Podrá encontrar orientaciones sobre el uso de los métodos *in vitro* en el contexto de REACH en el documento de orientación sobre los requisitos de información (apartado R.4.3.1.1 Datos *in vitro*) así como en el documento de orientación sobre los requisitos de información y la valoración de la seguridad química (R7a y R7b) para cada parámetro (eco)toxicológico.

3.2. ¿Cómo valorar y comunicar la adecuación e idoneidad de los métodos y datos in vitro para utilizarlos en REACH?

Cuando un método de ensayo *in vitro* validado se presente en el expediente de registro, los criterios de calidad especificados en el protocolo de la UE o de la OCDE para el parámetro correspondiente deberán ser evaluados y comunicados en el registro de estudios de parámetros relevante de IUCLID. Si el método está incluido en el Reglamento de métodos de ensayo de la UE o en las Directrices de ensayo de la OCDE, su adecuación para un determinado parámetro ya ha sido evaluada en el ámbito internacional y el método podrá utilizarse total o parcialmente en sustitución de los ensayos con animales. Deberán tenerse en cuenta las limitaciones que puedan describirse en el protocolo del método de ensayo o en los documentos de orientación técnica (por ejemplo, algunos métodos *in vitro* sólo son adecuados para predecir resultados positivos (indicación de una propiedad peligrosa), pero no para resultados negativos).
Si un solicitante de registro desea utilizar métodos *in vitro* prevalidados para cumplir con los requisitos de información de REACH, sólo podrá hacerlo en las condiciones especificadas en el anexo XI, punto 1.4. La idoneidad del método con arreglo a los criterios del CEVMA deberá ser evaluada y comunicada en el expediente IUCLID presentado.

En relación con la utilización de todos los demás métodos *in vitro* como parte del procedimiento de ponderación de las pruebas, deberán evaluarse los aspectos de calidad del método, como la relevancia del material de ensayo, la relevancia biológica, las normas de calidad (reproducibilidad de los resultados del ensayo) e incluirse en el expediente de IUCLID como parte del registro de estudios de parámetros.

3.3. ¿Pueden utilizarse métodos y datos in vitro con fines de clasificación y etiquetado o evaluación de riesgos?

A efectos de clasificación y etiquetado o evaluación de riesgos sólo podrán utilizarse métodos *in vitro* validados y prevalidados en condiciones concretas. Si se utiliza un método *in vitro* validado incluido en los anexos VII-X o un método de ensayo prevalidado que indique las propiedades peligrosas de una sustancia, los resultados podrán considerarse adecuados para la clasificación y etiquetado o para la evaluación de riesgos. Otros datos *in vitro* sólo podrán utilizarse como parte del procedimiento de ponderación de las pruebas para facilitar la toma de decisiones.

3.4. ¿Cómo utilizar métodos y datos in vitro como parte del procedimiento de ponderación de las pruebas?

La información obtenida por medio de métodos *in vitro* puede ser útil para obtener pruebas adicionales que ayuden a explicar las conclusiones de los ensayos *in vivo*. En particular, los datos metabólicos y cinéticos generados *in vitro* pueden ayudar a identificar el modo de acción si se combinan con datos obtenidos a partir de ensayos *in vivo* y ayudar también a desarrollar modelos cinéticos.
Metodologías avanzadas como la toxicogenómica también pueden ser útiles para la evaluación de riesgos y para facilitar la toma de decisiones sobre el diseño de estrategias de ensayo eficaces y eficientes, además de servir de base mecanística para estudiar el modo de acción, la relevancia biológica de los efectos observados en los estudios *in vivo* y la relevancia para el ser humano.

Cuando se utilicen datos *in vitro* en el expediente de registro como parte del procedimiento de ponderación de las pruebas, se seguirán las orientaciones indicadas en la Guía práctica 2 sobre el uso de la ponderación de las pruebas (Guía práctica 2 - Cómo comunicar la ponderación de las pruebas). En particular, los datos han de ser comunicados con el suficiente detalle para que se pueda determinar la relevancia en la evaluación de riesgos y se ha de documentar y comunicar debidamente la relevancia de dichos datos para el caso concreto en el expediente de registro.

3.5. ¿Cómo pueden utilizarse datos in vitro en la extrapolación y en la creación de categorías?

Los datos obtenidos por medio de métodos de ensayo *in vitro* pueden utilizarse para corregir deficiencias de datos cuando se proceda a la extrapolación de sustancias parecidas o a la agrupación de sustancias químicas. En estos casos, los datos *in vitro* pueden dilucidar consideraciones mecanísticas y contribuir a aumentar la solidez de la extrapolación en el contexto de la derivación de metabolitos comunes de sustancias similares (elaboración de perfiles metabólicos).
Además, los datos *in vitro* también pueden utilizarse para demostrar el valor biológico de la «terminología mecanística» utilizada en los modelos (Q)SAR, por ejemplo para ayudar a definir el ámbito de aplicabilidad de un modelo (Q)SAR.

3.6. ¿Cómo comunicar métodos y datos *in vitro* en IUCLID 5?

Cuando se utilicen métodos *in vitro* validados en un expediente de registro para cumplir los requisitos de REACH, deberá incluirse el resumen amplio de estudios o el resumen de estudios en el expediente IUCLID. En este caso, se deberán seguir las indicaciones de la guía práctica sobre el resumen amplio de estudios (Guía práctica 3: Cómo comunicar resúmenes amplios de estudios) y las orientaciones de IUCLID (Manual del usuario final de IUCLID 5) y será necesario aportar una descripción suficiente de las condiciones de ensayo, de los resultados y de su interpretación para tomar decisiones con respecto a la clasificación y etiquetado o a la evaluación de riesgos.
Si se presentan los resultados de un método *in vitro* prevalidado como un estudio clave con el fin de cumplir los requisitos de datos de un determinado parámetro, deberá quedar clara la relevancia del método. Además de los requisitos sobre el resumen amplio de estudios (ver Guía práctica 3: Cómo comunicar resúmenes amplios de estudios y el Manual del usuario final de IUCLID), será necesario incluir documentación del cumplimiento de los criterios para la evaluación de idoneidad con arreglo a los criterios del CEVMA en el expediente de registro a fin de evaluar la idoneidad del método y su aceptación potencial para la clasificación y etiquetado o para la evaluación de riesgos. Hay que recordar en este caso que si los resultados de estos métodos no indican determinadas propiedades peligrosas del parámetro concreto estudiado, deberá llevarse a cabo el ensayo relevante para confirmar los resultados negativos a menos que se pueda omitir el ensayo con arreglo a las normas generales y específicas de adaptación del régimen de ensayos estándar (anexos VII-XI).

Si se presentan los resultados de un método *in vitro* prevalidado o de un método *in vitro* no prevalidado como estudios complementarios o como parte del procedimiento de ponderación de las pruebas o como estudios descartados, esto deberá indicarse claramente y justificarse en el expediente de registro utilizando los campos IUCLID oportunos en los registros de estudios de parámetros. Encontrará más información sobre el empleo de la información de un procedimiento de ponderación de las pruebas en la Guía práctica 2: Cómo comunicar la ponderación de las pruebas. Si se utiliza este tipo de información en el contexto de la ponderación de las pruebas, será necesario aportar detalles del método en el formato IUCLID para resúmenes amplios de estudios. También deberá documentarse con detalle la relevancia de las conclusiones de los estudios en relación con las conclusiones extraídas del conjunto de datos general. Además, otros estudios también pueden requerir descripciones detalladas si son relevantes. En particular, en el caso de estudios defectuosos, pero que indiquen resultados críticos, será necesario preparar también resúmenes amplios de estudios que resalten las deficiencias de los estudios. Este tipo de estudios se podrán marcar como estudio desestimado en el campo «Purpose flag» de IUCLID.

3.7. Cómo comunicar el uso de datos de ensayos *in vitro* para cumplir un requisito de información estándar de un ensayo *in vivo*

En relación con algunos parámetros, es posible que un solicitante de registro pueda aportar información de ensayos *in vitro* para cumplir un requisito de información que de otro modo debería cumplir con datos de un ensayo *in vitro*. Por ejemplo, en el caso de una sustancia registrada por una cantidad de 10 o más toneladas anuales, el requisito de información

estándar es aportar datos de un estudio de irritación cutánea realizado *in vivo* (anexos VIII a X de REACH). En este ejemplo, el solicitante de registro podría justificar que los datos obtenidos de ensayos *in vitro* adecuados de irritación o corrosión cutáneas, que se hayan realizado en el contexto de una estrategia de ensayos integrada, cumple las normas específicas (columna 2 de los anexos VII-X) o generales (anexo XI) para la adaptación del régimen de ensayos estándar. En el futuro, es probable que se adopten otros métodos que utilicen baterías de ensayo *in vitro* para valorar adecuadamente otros parámetros, como la sensibilización cutánea, donde se podría determinar el potencial de sensibilización cutánea de una sustancia en el marco de una estrategia de ensayo que aplicase un procedimiento de ponderación de las pruebas utilizando una batería de métodos de ensayo *in vitro*.

En el escenario descrito, debería justificarse la adaptación del régimen de ensayos estándar en el expediente de registro. Por tanto, además del RAE generado para los estudios *in vitro* (véase la sección 3.6), el solicitante de registro debería generar y cumplimentar un registro de estudio del parámetro en el expediente IUCLID para el requisito de información *in vivo* respectivo. De no hacerse así, la presentación del expediente no pasará la comprobación de integridad técnica (TCC) y no se podrá presentar el expediente de registro.

Para cumplimentar el registro de estudio del parámetro *in vivo*, el solicitante de registro deberá seleccionar un marcador «purpose flag» para «Data waiving», que podría ser «study scientifically unjustified» o bien «other justification». En el campo «Justification for data waiving» deberá incluirse un razonamiento más detallado. La justificación dependerá de los pormenores del caso; por poner un ejemplo, según los criterios especificados en el anexo XI, apartado 1.4, utilización de estudios *in vitro* adecuados.

Para más información sobre el uso de datos *in vitro*, véase el webinario para solicitantes de registro principales que se llevó a cabo el 29 de febrero de 2012 con el título «Cómo utilizar datos *in vitro* para cumplir los requisitos de información de REACH (http://echa.europa.eu/web/guest/view-article/-/journal_content/7def3c04-4b2b-4cfd-86d0-5ce36797faa8).

4. ENLACES DE UTILIDAD

Guía práctica 3: Cómo preparar resúmenes amplios de estudios
http://echa.europa.eu/documents/10162/13643/pg_report_robust_study_summaries_es.pdf

Guía práctica 2: Cómo comunicar la ponderación de las pruebas
http://echa.europa.eu/documents/10162/13655/pg_report_weight_of_evidence_es.pdf

Sistema de seguimiento para el examen de métodos de prueba alternativos (TSAR) de la DG JRC http://tsar.jrc.ec.europa.eu/

TSAR es una herramienta que ofrece una perspectiva transparente de la situación de los métodos alternativos a lo largo de su evolución, desde que son protocolos puramente científicos presentados para la prevalidación hasta que se utilizan activamente en un contexto reglamentario.

Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (CEVMA) http://ecvam.jrc.it/

Ensayos químicos para la OCDE – Directrices
http://www.oecd.org/department/0,3355,en_2649_34377_1_1_1_1_1,00.html

Reglamento de métodos de ensayo de la CE http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:142:0001:0739:Es:PDF

Manual de usuario final IUCLID 5
http://iuclid.echa.europa.eu/index.php?fuseaction=home.documentation&type=public

Anexo 1. : Ejemplos

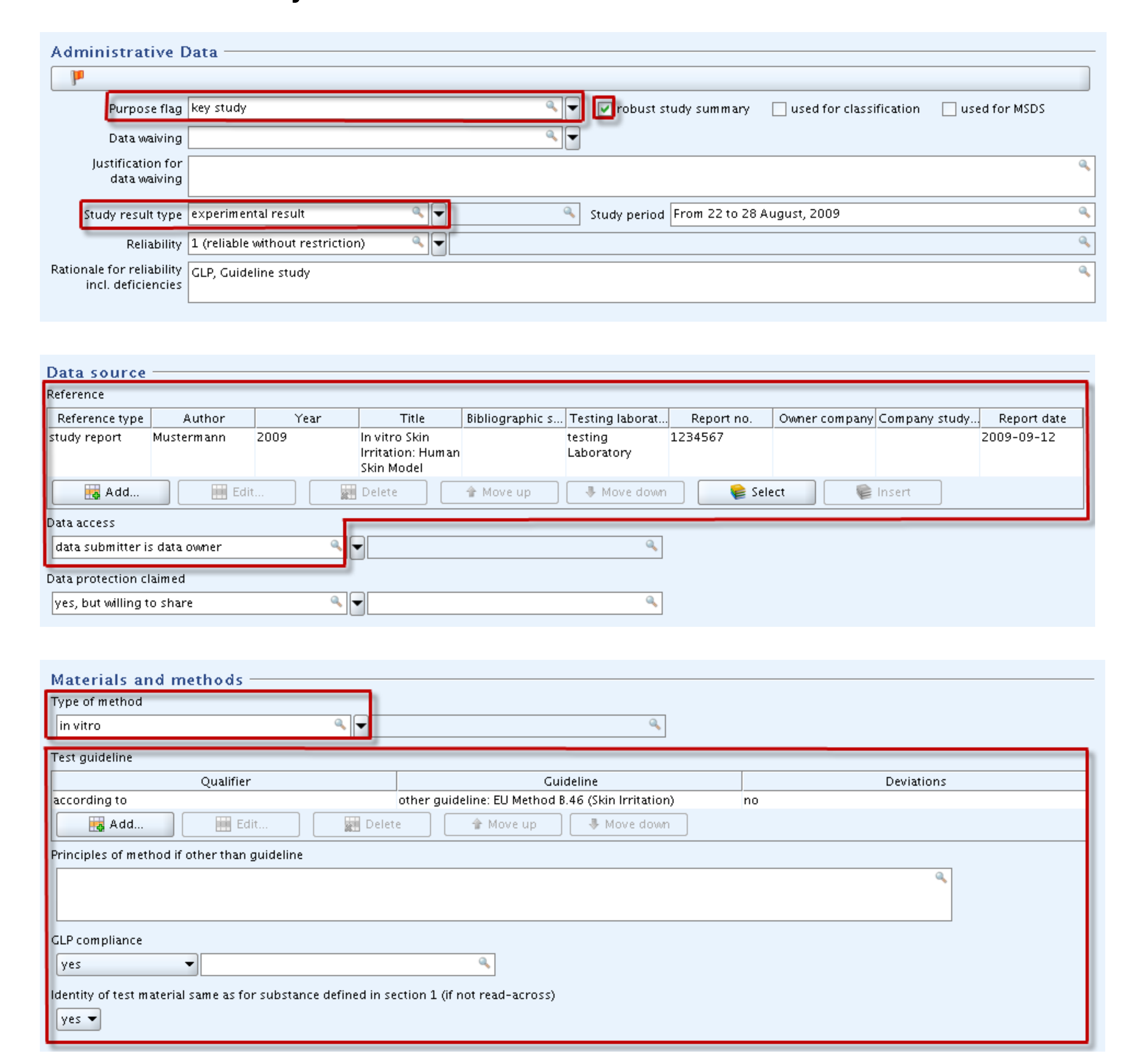
El anexo 1 incluye ejemplos ilustrativos de cómo cumplimentar un registro de estudios de parámetros en IUCLID cuando:

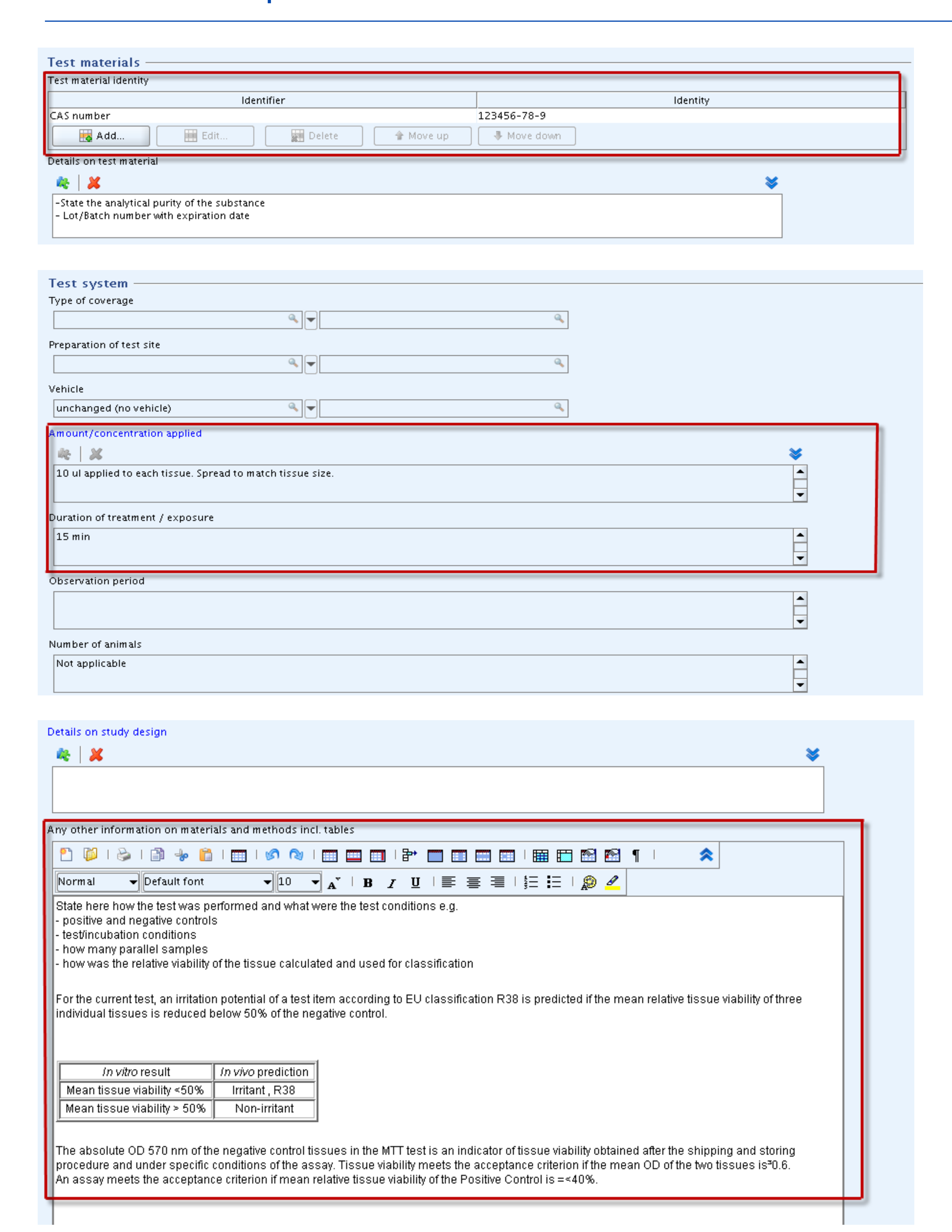
1. Se utiliza un método de ensayo *in vitro* validado como estudio clave.

2. Se utiliza un método de ensayo *in vitro* prevalidado como estudio clave.

3. Se utiliza un método de ensayo *in vitro* no prevalidado como estudio complementario.

1. Método de ensayo *in vitro* validado como estudio clave




Test materials

Test material identity

Identifier	Identity
CAS number	123456-78-9

Add... Edit... Delete Move up Move down

Details on test material

-State the analytical purity of the substance
- Lot/Batch number with expiration date

Test system

Type of coverage

Preparation of test site

Vehicle

unchanged (no vehicle)

Amount/concentration applied

10 ul applied to each tissue. Spread to match tissue size.

Duration of treatment / exposure

15 min

Observation period

Number of animals

Not applicable

Details on study design

Any other information on materials and methods incl. tables

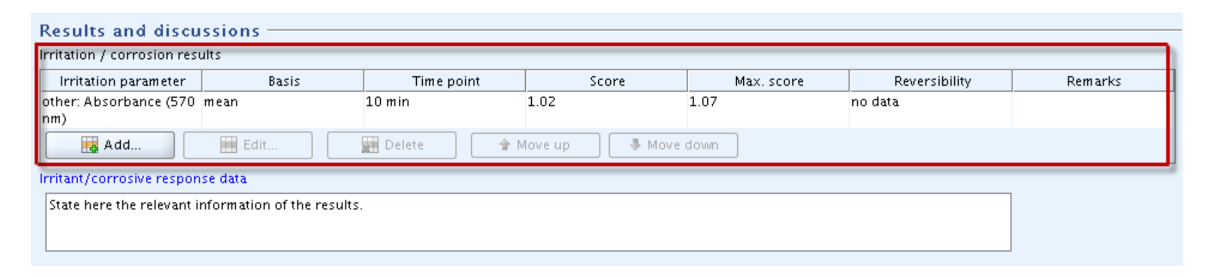
Normal Default font 10

State here how the test was performed and what were the test conditions e.g.
- positive and negative controls
- test/incubation conditions
- how many parallel samples
- how was the relative viability of the tissue calculated and used for classification

For the current test, an irritation potential of a test item according to EU classification R38 is predicted if the mean relative tissue viability of three individual tissues is reduced below 50% of the negative control.

In vitro result	*In vivo* prediction
Mean tissue viability <50%	Irritant , R38
Mean tissue viability > 50%	Non-irritant

The absolute OD 570 nm of the negative control tissues in the MTT test is an indicator of tissue viability obtained after the shipping and storing procedure and under specific conditions of the assay. Tissue viability meets the acceptance criterion if the mean OD of the two tissues is^{3}0.6.
An assay meets the acceptance criterion if mean relative tissue viability of the Positive Control is =<40%.


Results and discussions

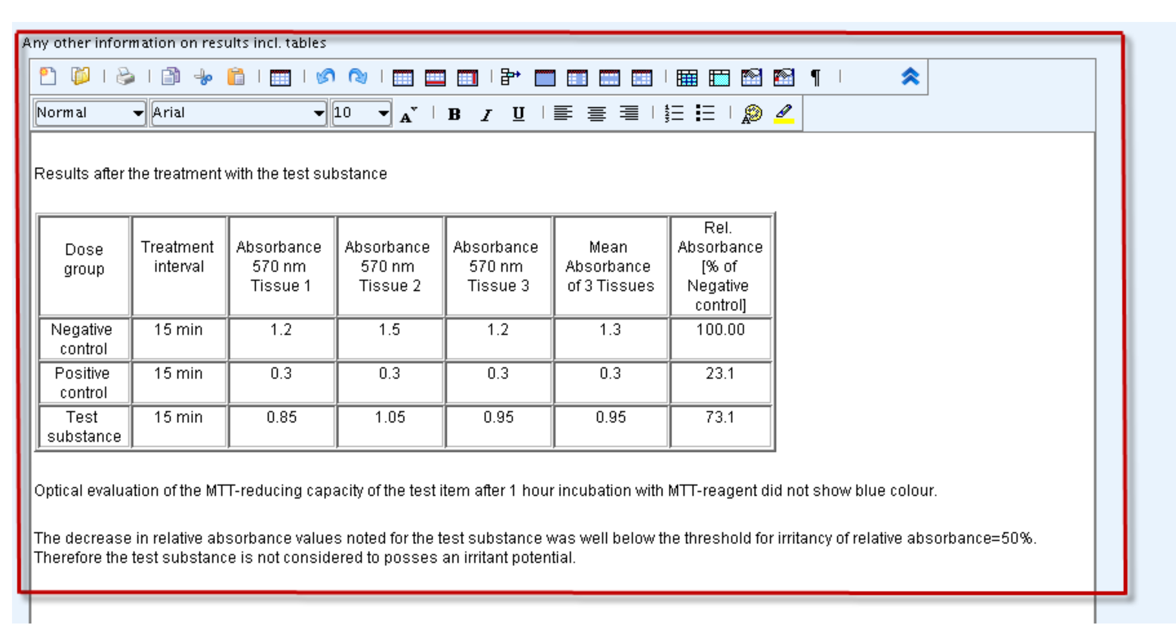
Irritation / corrosion results

Irritation parameter	Basis	Time point	Score	Max. score	Reversibility	Remarks
other: Absorbance (570 nm)	mean	10 min	1.02	1.07	no data	

Add... Edit... Delete Move up Move down

Irritant/corrosive response data

State here the relevant information of the results.


Any other information on results incl. tables

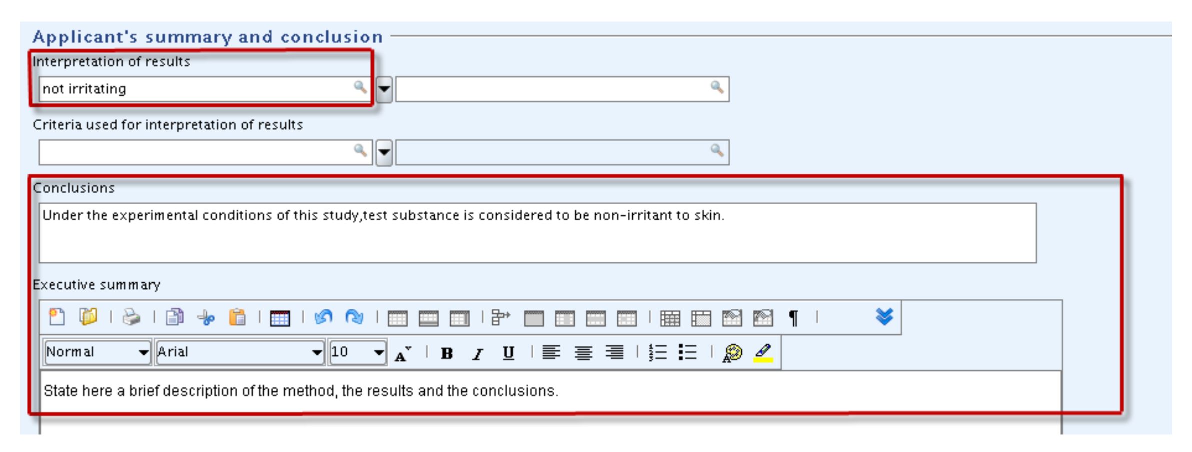
Normal Arial 10

Results after the treatment with the test substance

Dose group	Treatment interval	Absorbance 570 nm Tissue 1	Absorbance 570 nm Tissue 2	Absorbance 570 nm Tissue 3	Mean Absorbance of 3 Tissues	Rel. Absorbance [% of Negative control]
Negative control	15 min	1.2	1.5	1.2	1.3	100.00
Positive control	15 min	0.3	0.3	0.3	0.3	23.1
Test substance	15 min	0.85	1.05	0.95	0.95	73.1

Optical evaluation of the MTT-reducing capacity of the test item after 1 hour incubation with MTT-reagent did not show blue colour.

The decrease in relative absorbance values noted for the test substance was well below the threshold for irritancy of relative absorbance=50%. Therefore the test substance is not considered to posses an irritant potential.


Applicant's summary and conclusion

Interpretation of results

not irritating

Criteria used for interpretation of results

Conclusions

Under the experimental conditions of this study,test substance is considered to be non-irritant to skin.

Executive summary

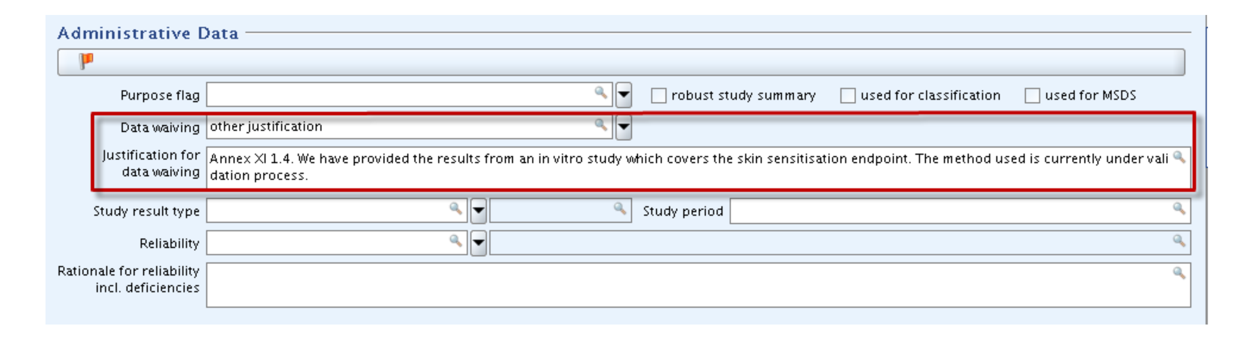
Normal Arial 10

State here a brief description of the method, the results and the conclusions.

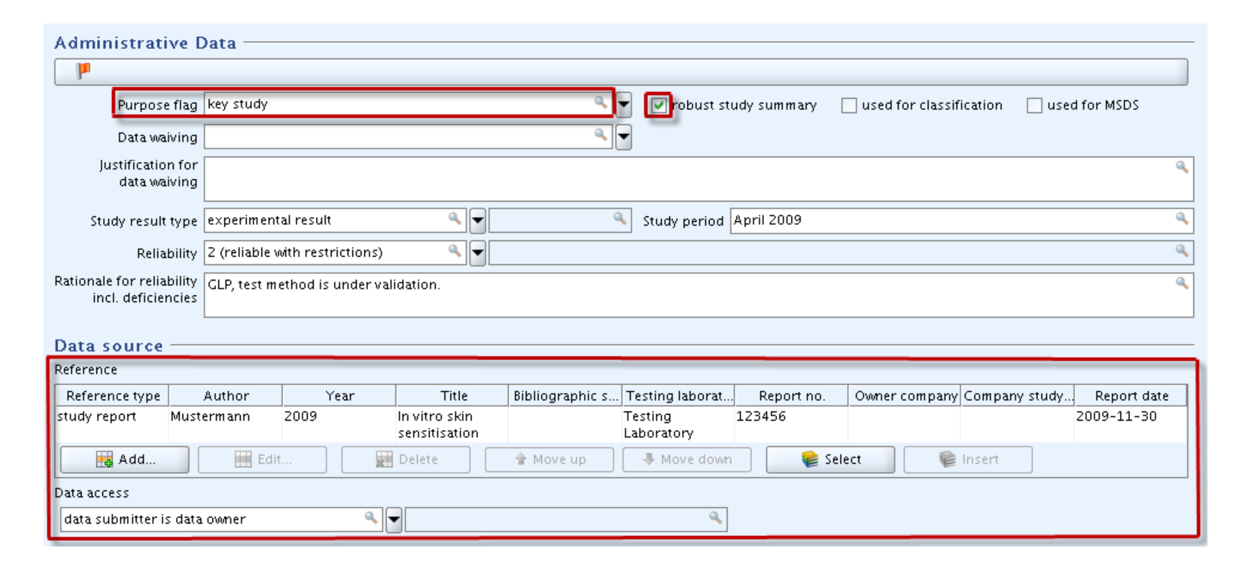
2. Método de ensayo *in vitro* prevalidado como estudio clave

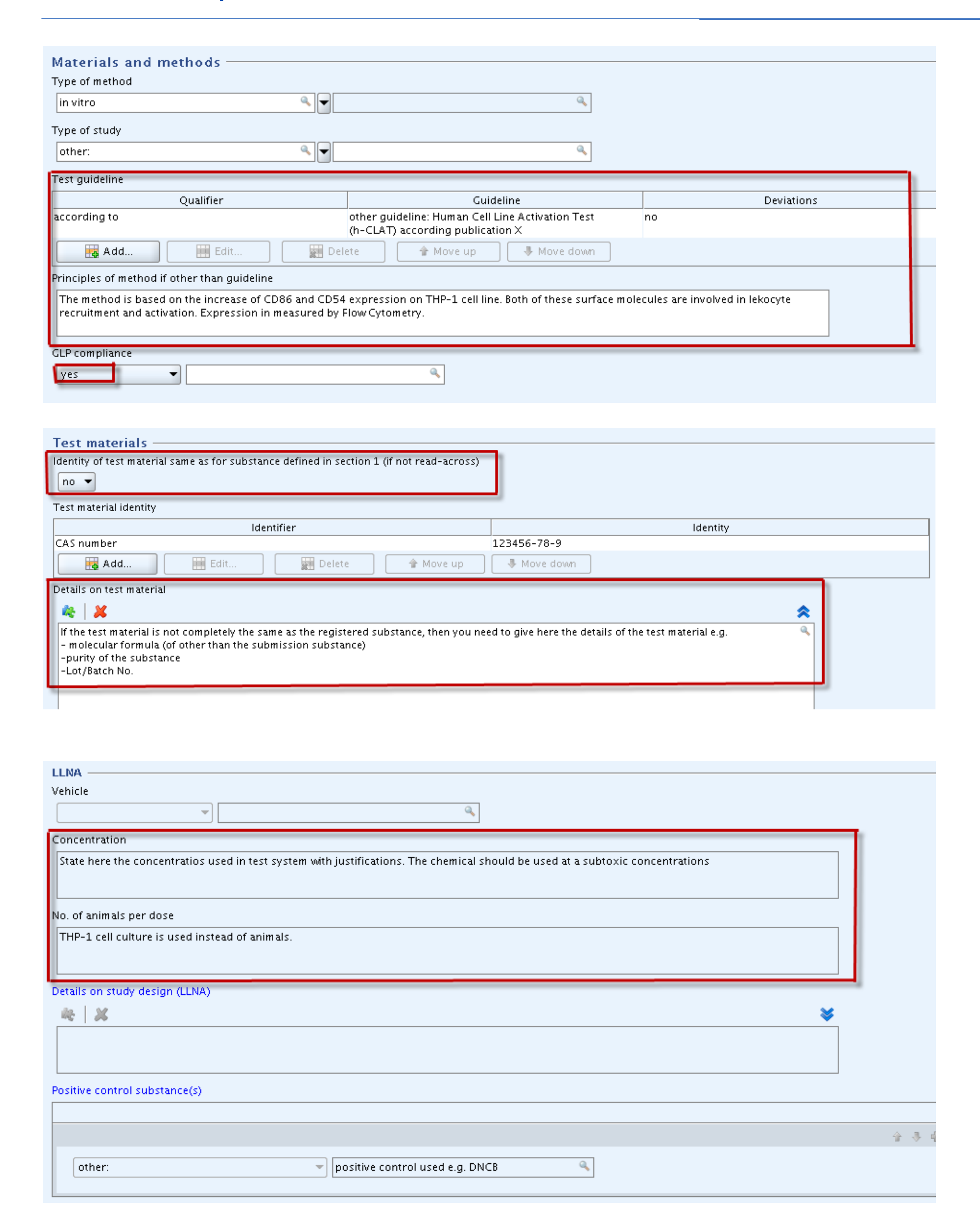
Nota: Si desea utilizar datos *in vitro* de sensibilización cutánea como un estudio clave, a fin de pasar la comprobación de integridad técnica (TCC), tendrá que aportar un registro de estudios de parámetros adicional para poder omitir el ensayo *in vivo* con la justificación que se indica en el ejemplo siguiente (anexo VII, punto 8.3, columna 2).

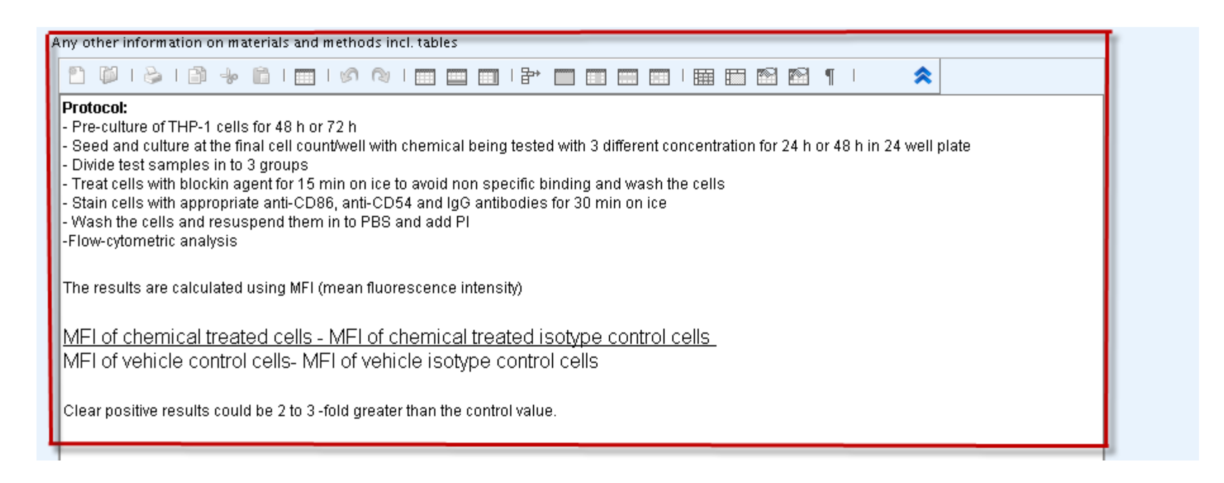
Exención

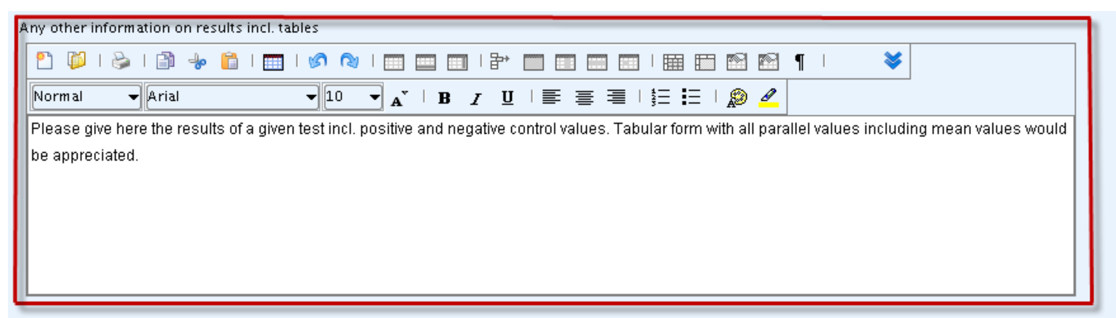


Estudio clave



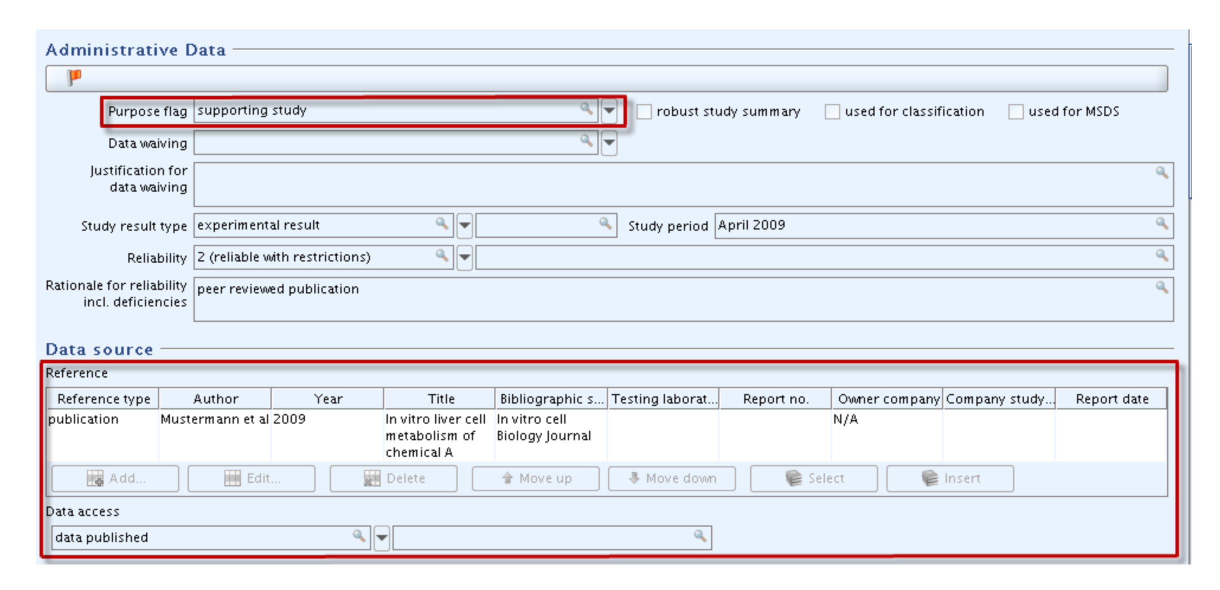

Materials and methods
Type of method
in vitro
Type of study
other:
Test guideline
Qualifier
Guideline
Deviations
according to
other guideline: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) according publication X
no
Add...
Edit...
Delete
Move up
Move down
Principles of method if other than guideline
The method is based on the increase of CD86 and CD54 expression on THP-1 cell line. Both of these surface molecules are involved in lekocyte recruitment and activation. Expression in measured by Flow Cytometry.
GLP compliance
yes
Test materials
Identity of test material same as for substance defined in section 1 (if not read-across)
no
Test material identity
Identifier
Identity
CAS number
123456-78-9
Add...
Edit...
Delete
Move up
Move down
Details on test material
If the test material is not completely the same as the registered substance, then you need to give here the details of the test material e.g.
- molecular formula (of other than the submission substance)
-purity of the substance
-Lot/Batch No.
LLNA
Vehicle
Concentration
State here the concentratios used in test system with justifications. The chemical should be used at a subtoxic concentrations
No. of animals per dose
THP-1 cell culture is used instead of animals.
Details on study design (LLNA)
Positive control substance(s)
other:
positive control used e.g. DNCB

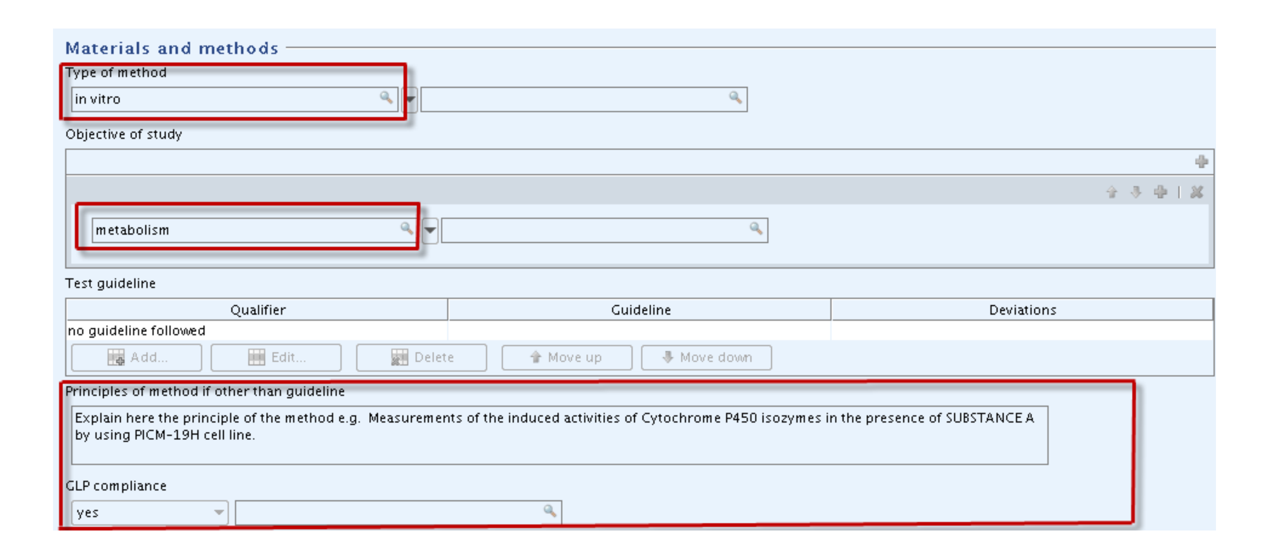

Any other information on materials and methods incl. tables
Protocol:
- Pre-culture of THP-1 cells for 48 h or 72 h
- Seed and culture at the final cell count/well with chemical being tested with 3 different concentration for 24 h or 48 h in 24 well plate
- Divide test samples in to 3 groups
- Treat cells with blockin agent for 15 min on ice to avoid non specific binding and wash the cells
- Stain cells with appropriate anti-CD86, anti-CD54 and IgG antibodies for 30 min on ice
- Wash the cells and resuspend them in to PBS and add PI
-Flow-cytometric analysis
The results are calculated using MFI (mean fluorescence intensity)
MFI of chemical treated cells - MFI of chemical treated isotype control cells
MFI of vehicle control cells- MFI of vehicle isotype control cells
Clear positive results could be 2 to 3 -fold greater than the control value.

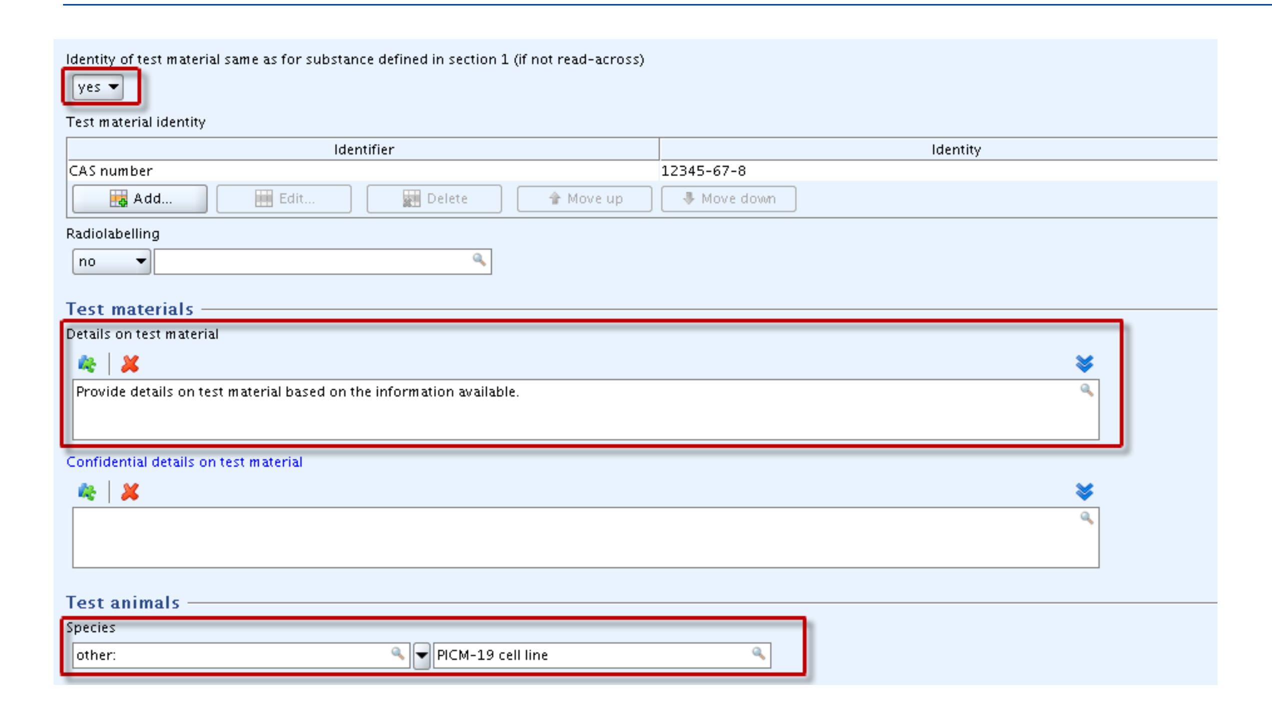

Any other information on results incl. tables
Normal
Arial
10
Please give here the results of a given test incl. positive and negative control values. Tabular form with all parallel values including mean values would be appreciated.

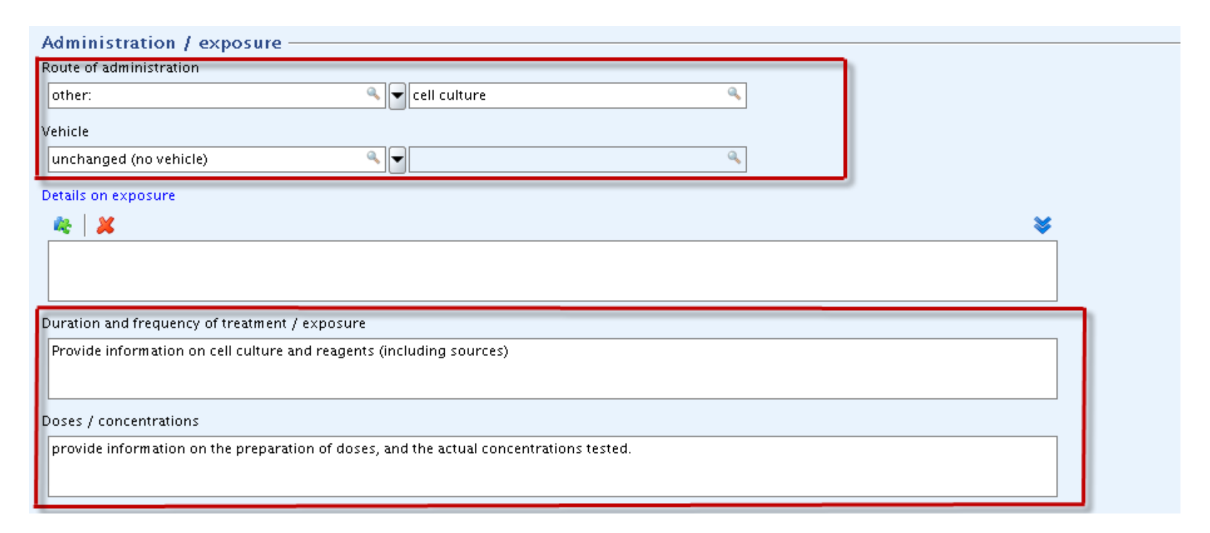

Applicant's summary and conclusion
Interpretation of results
sensitising
Conclusions
Give here your conclusions.

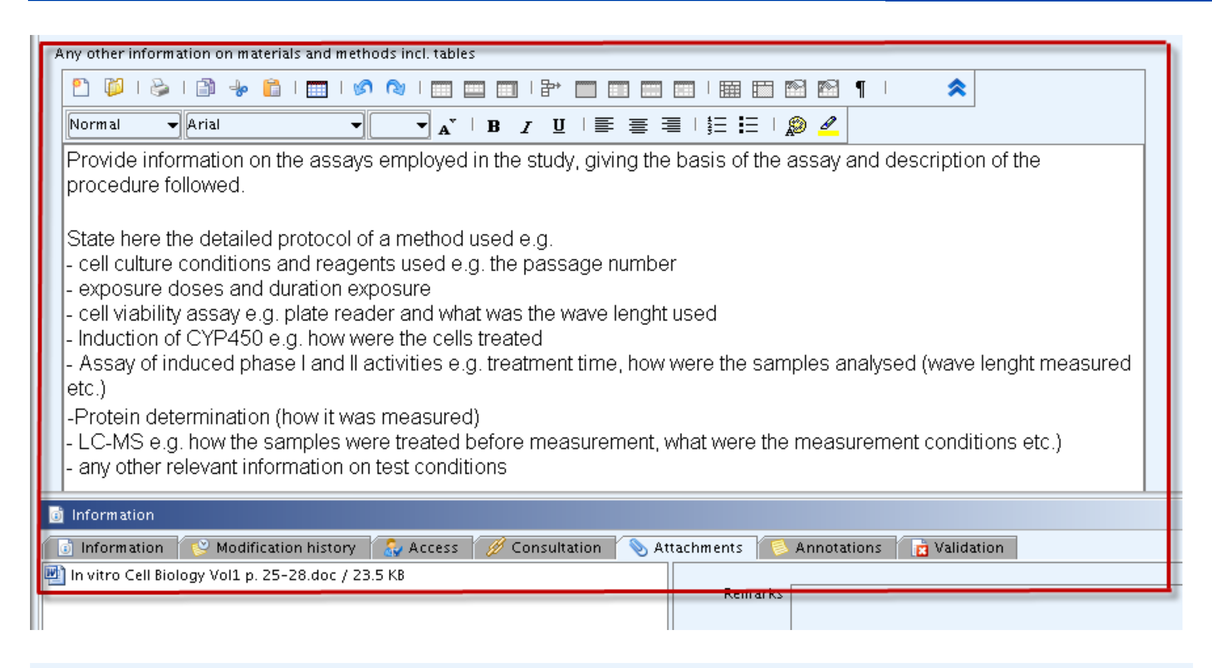
3. Método de ensayo *in vitro* no prevalidado como estudio clave
(IUCLID, sección 7.1.1. Toxicocinética básica)

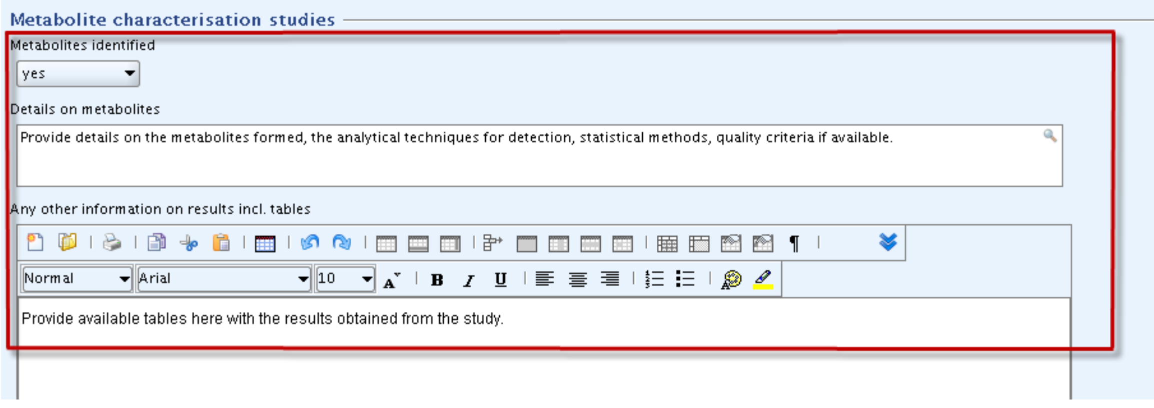


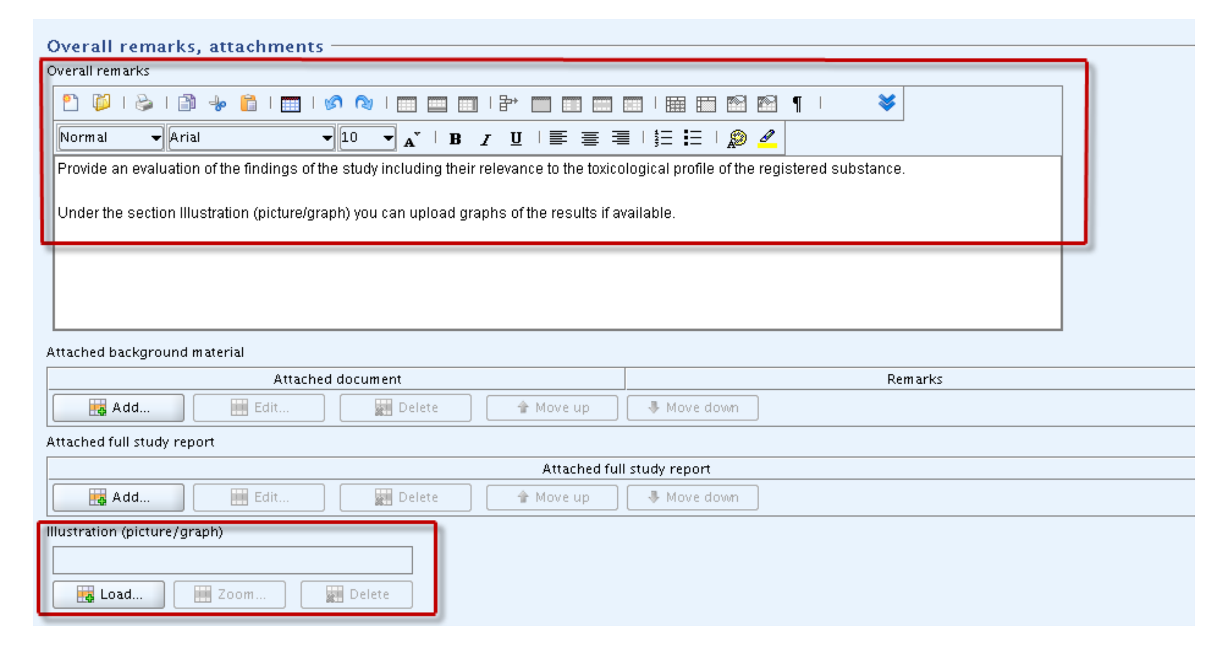


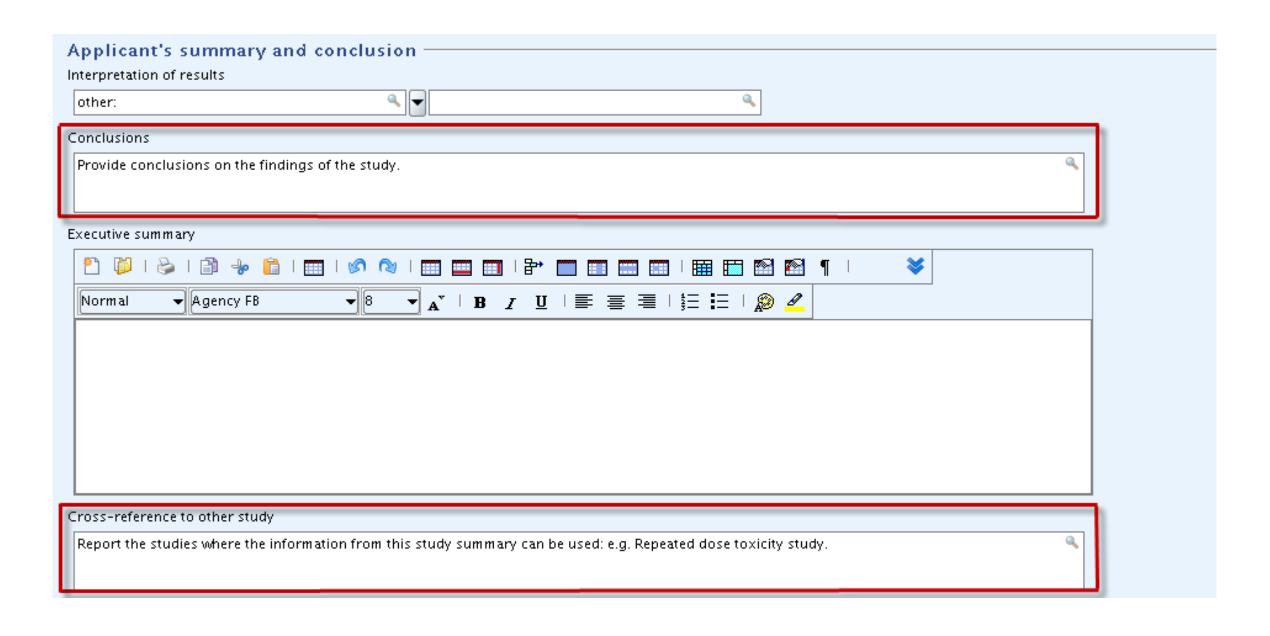

Identity of test material same as for substance defined in section 1 (if not read-across)
yes
Test material identity
Identifier
Identity
CAS number
12345-67-8
Add...
Edit...
Delete
Move up
Move down
Radiolabelling
no
Test materials
Details on test material
Provide details on test material based on the information available.
Confidential details on test material
Test animals
Species
other:
PICM-19 cell line


Administration / exposure
Route of administration
other:
cell culture
Vehicle
unchanged (no vehicle)
Details on exposure
Duration and frequency of treatment / exposure
Provide information on cell culture and reagents (including sources)
Doses / concentrations
provide information on the preparation of doses, and the actual concentrations tested.


Any other information on materials and methods incl. tables
Normal
Arial
Provide information on the assays employed in the study, giving the basis of the assay and description of the procedure followed.
State here the detailed protocol of a method used e.g.
- cell culture conditions and reagents used e.g. the passage number
- exposure doses and duration exposure
- cell viability assay e.g. plate reader and what was the wave lenght used
- Induction of CYP450 e.g. how were the cells treated
- Assay of induced phase I and II activities e.g. treatment time, how were the samples analysed (wave lenght measured etc.)
-Protein determination (how it was measured)
- LC-MS e.g. how the samples were treated before measurement, what were the measurement conditions etc.)
- any other relevant information on test conditions
Information
Information
Modification history
Access
Consultation
Attachments
Annotations
Validation
In vitro Cell Biology Vol1 p. 25-28.doc / 23.5 KB
Remarks


Metabolite characterisation studies
Metabolites identified
yes
Details on metabolites
Provide details on the metabolites formed, the analytical techniques for detection, statistical methods, quality criteria if available.
Any other information on results incl. tables
Normal
Arial
10
Provide available tables here with the results obtained from the study.


Overall remarks, attachments
Overall remarks
Normal
Arial
10
Provide an evaluation of the findings of the study including their relevance to the toxicological profile of the registered substance.
Under the section Illustration (picture/graph) you can upload graphs of the results if available.
Attached background material
Attached document
Remarks
Add...
Edit...
Delete
Move up
Move down
Attached full study report
Attached full study report
Add...
Edit...
Delete
Move up
Move down
Illustration (picture/graph)
Load...
Zoom...
Delete


Applicant's summary and conclusion
Interpretation of results
other:
Conclusions
Provide conclusions on the findings of the study.
Executive summary
Normal
Agency FB
8
Cross-reference to other study
Report the studies where the information from this study summary can be used: e.g. Repeated dose toxicity study.

EUROPEAN CHEMICALS AGENCY
ANNANKATU 18, P.O. BOX 400,
FI-00121 HELSINKI, FINLAND
ECHA.EUROPA.EU